

26.04.00

JP00/02022

日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

E K U

REC'D	27 JUL 2000
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 3月30日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第087929号

出願人
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社
アブジェニックス インコーポレイテッド

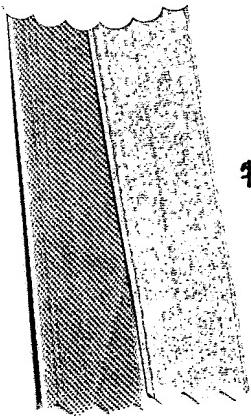
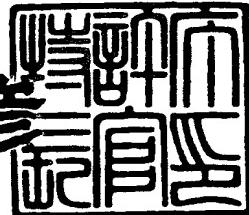
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3051932

【書類名】 特許願
【整理番号】 J99-0054
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
【発明者】

【住所又は居所】 大阪府高槻市紫町1-1 日本たばこ産業株式会社医薬
総合研究所内

【氏名】 楠 千洋

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-2 日本たばこ産
業株式会社医薬探索研究所内

【氏名】 福嶋 淳

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代表者】 水野 勝

【代理人】

【識別番号】 100100217

【弁理士】

【氏名又は名称】 大東 輝雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 058632

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803681

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 モノクロナール抗体の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子を有する細胞によるモノクロナール抗体の製造方法であって、

(1) IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子を有しモノクロナール抗体を生産する細胞に、該IgH鎖遺伝子の遺伝子産物と同じアミノ酸配列をコードするIgH鎖遺伝子を該細胞に導入する工程、

(2) 得られた形質転換細胞を培養する工程

よりなることを特徴とするモノクロナール抗体の製造方法。

【請求項2】 細胞が哺乳動物由来の細胞である請求項1記載のモノクロナール抗体の製造法。

【請求項3】 細胞がハイブリドーマである請求項1記載のモノクロナール抗体の製造方法。

【請求項4】 細胞の有するIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子が同一の哺乳動物由来である請求項1記載のモノクロナール抗体の製造方法。

【請求項5】 細胞に導入するIgH鎖遺伝子が宿主の有するIgH鎖遺伝子と同じ塩基配列を有する遺伝子である請求項1記載のモノクロナール抗体の製造方法。

【請求項6】 細胞がヒト由来のIgH鎖遺伝子およびヒト由来のIgL鎖遺伝子を有するハイブリドーマである請求項1記載のモノクロナール抗体の製造方法。

【請求項7】 細胞の有するIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の定常領域がヒト由来の遺伝子であり、IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の可変領域が非ヒト由来の遺伝子である請求項1記載のモノクロナール抗体の製造方法。

【請求項8】 細胞の有するIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の定常領域がヒト由来の遺伝子であり、IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の超可変領域（CDR）が非ヒト由来の遺伝子である請求項1記載のモノクロナール抗体の製造方法。

【請求項9】 モノクロナール抗体を生産する細胞を、該細胞の有するIgH鎖遺伝子の遺伝子産物と同じアミノ酸配列をコードするIgH鎖遺伝子で形質転換して得られた形質転換細胞。

【請求項10】 モノクロナール抗体を生産する細胞が哺乳動物由来である請求項9記載の形質転換細胞。

【請求項11】 モノクロナール抗体を生産する細胞がハイブリドーマである請求項9記載の形質転換細胞。

【請求項12】 モノクロナール抗体を生産する細胞のIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子が同一の哺乳動物由来である請求項9記載の形質転換細胞。

【請求項13】 導入するIgH鎖遺伝子がモノクロナール抗体を生産する細胞が有するIgH鎖遺伝子と同一の配列を有するものである請求項9記載の形質転換細胞。

【請求項14】 モノクロナール抗体を生産する細胞のIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子がヒト由来である請求項9記載の形質転換細胞。

【請求項15】 IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の定常領域がヒト由来の遺伝子であり、IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の可変領域が非ヒト由来の遺伝子である請求項9記載の形質転換細胞。

【請求項16】 IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の定常領域がヒト由来の遺伝子であり、IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の超可変領域（CDR）が非ヒト由来の遺伝子である請求項9記載の形質転換細胞。

【発明の詳細な説明】

【00001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、モノクロナール抗体を製造する方法に関するものであり、モノクロナール抗体の生産量を高める方法に関する。

【00002】

【従来の技術】

特定の特異性を有するモノクロナール抗体は疾病治療に有用なものであり、その使用のためには望む性質を有する均一なモノクロナール抗体を大量に必要としている。

【00003】

抗体は、B細胞で生成される蛋白質で、免疫グロブリン、抗体ともいわれ（本

明細書中において抗体を「免疫グロブリン」ということもある) 細菌、ウィルスのような外来抗原に対する免疫系において不可欠な役割を担っている。その分子構造は基本的に2本の長いポリペプチド鎖(H鎖と呼ばれる)と2本の短いポリペプチド鎖(L鎖と呼ばれる)のポリペプチド鎖から構成される。2本のH鎖は、相互にジスルフィド結合で結ばれ、L鎖はそれぞれ、H鎖にジスルフィド結合している。そして、これらH鎖、L鎖はそれぞれ可変領域(VH, VL)、定常領域(CH, CL)を有している。

【00004】

抗体を生産するための方法は、動物を抗原で免疫して、この動物の血清から抗体を採集することができる。しかし、この方法によって得られる抗体は様々な種類の抗体分子を含み、このような混合物から特定の種類の望む特異性を有する抗体(モノクロナール抗体)を単離するためには、非常に困難な精製過程を経る必要があった。

コーラーとミュルシュタインは、一つのIg生産細胞をミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマ細胞からモノクロナール抗体を生産する技術を提供した(Nature, 256, 495, 1975)。モノクロナール抗体は、上述の血清から得られる抗体(ポリクロナール抗体)に比べ、その特異性、安定性などにおいて特段に優れることから医学領域に応用されるようになった。

【00005】

また、近年の遺伝子組換え技術の発展により、望む性質を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子を宿主細胞中に導入し、所望のモノクロナール抗体を宿主細胞中で生成させることができた。例えば、オチ(Ochi)等らは、ハプテン特異的なマウスIgM由来のH鎖遺伝子(μ)とL鎖遺伝子(κ)を宿主であるハイブリドーマに導入し、その形質転換体がハプテン特異的なIgMを生成したことを見出している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol.80, 6351 (1983))。

【00006】

しかし、ハイブリドーマの抗体生産力は低く、ヒト-ヒトハイブリドーマによる抗体を産生させるにあたって、インターロイキン-2を添加した培地で培養すると抗体の産生量が増大する旨の報告がされている(Cellular immunology, 115

, 325-333(1988))。しかしながらこの方法によっても、抗体の產生量は十分とは言い難い。

一般に、ハイブリドーマや抗体遺伝子を組み込んだ宿主細胞によりモノクロナル抗体を大量に商業的に生産させる手段として、培養液当たりの細胞数を増加させる方法と、細胞当たりの物質生産を向上させる方法が考えられる。培養液当たりの細胞数を増加させることは好ましい方法であるが、細胞数の増加が必ずしも抗体の高生産につながるとは限らず、抗体生産性の高い細胞を増加させることが必要である。すなわち、培養をより効率的に行うために、ハイブリドーマや宿主細胞の抗体生産性が十分に高い細胞株を選択しなければならない。そしてこの選択作業に多大な労力と時間を必要としている。

【00007】

一方、遺伝子組換え技術を用いた目的蛋白質の発現技術において、目的遺伝子の発現効率を高めるため、dhfr遺伝子やグルタミン合成酵素（GS）遺伝子を用いて、目的蛋白質遺伝子のコピー数を増幅する方法が開発されている（W081/02426, W087/04462）。

これらの方は、

(1) dhfrあるいはグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を目的の蛋白質遺伝子に連結し、これを宿主細胞に組み込んで形質転換体を得る工程、

(2) 得られた形質転換体を例えば、メソトレキセイト（MTX）あるいはホスフィノトリシン、メチオニンスルホキシミン等の存在下で培養して、耐性株を選択する工程、

よりなる。

この方法により得られた耐性株は、導入されたdhfr遺伝子やGS遺伝子のコピー数が増大（遺伝子増幅）している。この遺伝子増幅において、増幅される遺伝子の範囲がdhfr遺伝子あるいはGS遺伝子に隣接する発現単位を含むことが多いので、耐性株を選択する操作により、目的蛋白質遺伝子のコピー数が増加し、発現が増強された高発現細胞株を得ることができる。

【00008】

しかし、抗体遺伝子を内在しているハイブリドーマの場合には、

- (1) H鎖およびL鎖遺伝子を細胞に導入せず、
- (2) さらに遺伝子増幅に必要なマーカーが抗体遺伝子の近傍にない、
ことから、遺伝子増幅法を適用できない。

【00009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、より簡便な操作で確実に、細胞、特にハイブリドーマによるモノクロナール抗体の発現効率を高めることを目的とする。すなわち、これまで抗体発現量を向上させることが困難であったハイブリドーマによるモノクロナール抗体発現効率を改善することを目的とする。

本発明者等は、ハイブリドーマによるモノクロナール抗体生産において、L鎖に比べH鎖の発現がしばしば不安定であり、場合によっては抗体の発現が停止してしまうこともあることに着目し、H鎖の発現を改善することにより抗体の発現レベルを向上させることを目的に銳意研究を進め、本発明を完成した。

本発明者らは、モノクロナール抗体を発現するハイブリドーマにおいて、抗体の発現量はH鎖の発現量に依存していると考え、H鎖の発現を改善することを目的として、該ハイブリドーマに該ハイブリドーマ由来のH鎖を導入した。この結果、ハイブリドーマによるモノクロナール抗体の発現量が向上したことから、H鎖の発現を改善することにより抗体の発現レベルを向上させる考えが正しいことを確認された。このことから細胞におけるモノクロナール抗体生産は、H鎖の生産量により影響を受けるものと推測される。

【00010】

【問題を解決するための手段】

本発明は、モノクロナール抗体を発現している細胞の抗体の発現レベルを、H鎖の発現を改善することにより向上させる方法を提供する。具体的には以下に述べるものである。

(1) IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子を有する細胞によるモノクロナール抗体の製造方法であって、

① IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子を有しモノクロナール抗体を生産する細胞に、該IgH鎖遺伝子の遺伝子産物と同じアミノ酸配列をコードするIgH鎖遺伝子を該細

胞に導入する工程、

②得られた形質転換細胞を培養する工程

よりなることを特徴とするモノクロナール抗体の製造方法。

(2) 細胞が哺乳動物由来の細胞である(1)記載のモノクロナール抗体の製造法。

(3) 細胞がハイブリドーマである(1)記載のモノクロナール抗体の製造方法。

(4) 細胞の有するIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子が同一の哺乳動物由来である

(1)記載のモノクロナール抗体の製造方法。

(5) 細胞に導入するIgH鎖遺伝子が宿主の有するIgH鎖遺伝子と同じ塩基配列を有する遺伝子である(1)記載のモノクロナール抗体の製造方法。

(6) 細胞がヒト由来のIgH鎖遺伝子およびヒト由来のIgL鎖遺伝子を有するハイブリドーマである(1)記載のモノクロナール抗体の製造方法。

(7) 細胞の有するIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の定常領域がヒト由来の遺伝子であり、IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の可変領域が非ヒト由来の遺伝子である(1)記載のモノクロナール抗体の製造方法。

(8) 細胞の有するIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の定常領域がヒト由来の遺伝子であり、IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の超可変領域(CDR)が非ヒト由来の遺伝子である(1)記載のモノクロナール抗体の製造方法。

(9) モノクロナール抗体を生産する細胞を、該細胞の有するIgH鎖遺伝子の遺伝子産物と同じアミノ酸配列をコードするIgH鎖遺伝子で形質転換して得られた形質転換細胞。

(10) モノクロナール抗体を生産する細胞が哺乳動物由来である(9)記載の形質転換細胞。

(11) モノクロナール抗体を生産する細胞がハイブリドーマである(9)記載の形質転換細胞。

(12) モノクロナール抗体を生産する細胞のIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子が同一の哺乳動物由来である(9)記載の形質転換細胞。

(13) 導入するIgH鎖遺伝子がモノクロナール抗体を生産する細胞が有するIgH

鎖遺伝子と同一の配列を有するものである（9）記載の形質転換細胞。

（14）モノクロナール抗体を生産する細胞のIgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子がヒト由来である（9）記載の形質転換細胞。

（15）IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の定常領域がヒト由来の遺伝子であり、IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の可変領域が非ヒト由来の遺伝子である（9）記載の形質転換細胞。

（16）IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の定常領域がヒト由来の遺伝子であり、IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子の超可変領域（CDR）が非ヒト由来の遺伝子である（9）記載の形質転換細胞。

【00011】

[本明細書中の用語の定義]

（A）モノクロナール抗体

本明細書中で用いるモノクロナール抗体とは、ヒトを含む哺乳動物由来のIgA, IgD, IgE, IgG, IgMのすべての種類を含み、その抗原は、抗原性を有するものであればよく、例えばIgGの場合、サイトカイン、CMV、HCV等のウイルス蛋白、カルシトニン、PTH等のホルモン、FCF、VEGF等の血管形成誘導因子、サイトカイン等の受容体等の抗原により誘導されたものであればよく、ここに記載した抗原に限定されるものではない。ここで、サイトカインはIL-1、IL-2等のインターロイキン、MCAF、MIP-1等のケモカイン、SCF、G-CSF等の造血因子、TNF α 等の細胞傷害因子を例としてあげることができる。また、哺乳動物の種類も特に限定されるものではないが、ヒト由来のIgGが特に望ましい。

また、IgGのIgH鎖とIgL鎖の可変領域あるいは超可変領域（CDR）と定常領域は、それぞれの由来がヒト由来のものであることが好ましいが、それぞれが非ヒトの同一動物種であっても、あるいは異なる動物種、例えば、可変領域あるいは超可変領域が非ヒト由来で定常領域がヒト由来のキメラ体であってもよい。また、IgH鎖定常領域にはさらに、細胞毒蛋白等の非Ig性蛋白が連結されていてもよい。

【00012】

（B）IgH鎖遺伝子、IgL鎖遺伝子

前述したように、抗体を構成するものであり、ヒトを含む哺乳動物由来のIgA, IgD, IgE, IgG, IgMをコードする遺伝子を含む。また、抗原性を有する物質によって誘導されたモノクロナール抗体に由来する遺伝子であればよく、抗原の種類は問わない。抗原は、例えば前述したサイトカイン、CMV、HCV等のウイルス蛋白、カルシトニン、PTH等のホルモン、FCF、VEGF等の血管形成誘導因子等ならびに前述のサイトカイン等の受容体等、抗原性を有するものであればよい。

細胞に導入するIgH鎖遺伝子は少なくとも可変領域をコードする領域を含んでいればよく、さらに定常領域を含む全領域をコードする遺伝子を含んでいてもよい。なお、定常領域を含む領域の場合、可変領域あるいは超可変領域（CDR）と定常領域の由来は、同一種であることが望ましいが、異なる動物種に由来するキメラ遺伝子であっても良い。しかし、定常領域をコードする遺伝子はヒト由来であることが望ましい。

また、IgH鎖定常領域遺伝子には細胞毒蛋白等の非Ig性蛋白をコードする遺伝子が連結されていてもよい。

【00013】

(C) 細胞

本発明で用いるモノクロナール抗体を產生する細胞は、モノクロナール抗体を生産している細胞であれば、どのような細胞であってもよく、その動物種の由来も問わない。例えば、モノクロナール抗体を產生するハイブリドーマであってもよく、また抗体遺伝子を導入することにより抗体を生産することができるようになった動物細胞であってもよい。形質転換により抗体を発現する動物細胞はどのようなものでもかまわないが、樹立細胞株が望ましい。例えば、末梢血リンパ球（PBL）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞）を挙げることができ、CHO細胞が特に望ましい。

ハイブリドーマは、目的とするモノクロナール抗体を產生しているものであればよく、特にヒト由来の抗体を產生するハイブリドーマが好ましい。ヒト由来の抗体を產生するハイブリドーマは、例えば、抗B型肝炎ウイルス表面抗原に対するヒトモノクロナール抗体を產生するW471-7.24細胞（Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 142, 805 (1987)）あるいは、Nature genetics vol.15, 146-156

(1997)に記載された方法によりマウス細胞より得ること可能である。

【00014】

本発明の抗体高発現の方法は、

(1) 目的とするモノクロナール抗体を生産する細胞からH鎖遺伝子をクローニングし、(2) 該モノクロナール抗体を生産する細胞に、得られたH鎖遺伝子を導入し、

(3) 得られた形質転換細胞を培養することにより実施することができる。

以下に、本発明の抗体高発現細胞を得るための各工程を簡単に説明する。

(イ) 抗体遺伝子のクローニング

動物を抗原で免疫して得られた動物細胞あるいはハイブリドーマから常法、例えば3' RACEあるいは5' RACE等のPCR法等の方法によりクローニングを行うことにより、目的とする抗体遺伝子を得ることができる。抗原は、前述のサイトカインやCMV、HCV等のウィルス蛋白、カルシトニン、PTH等のホルモン、FCF、VEGF等の血管形成誘導因子等の抗原性を有するものを用いることができる。

形質転換の対象となる細胞がすでに目的とする抗体を產生するハイブリドーマである場合には、該ハイブリドーマがすでに1対のL鎖、H鎖遺伝子を内在しているため、H鎖遺伝子だけをクローニングすればよい。

一方、CHO細胞等のように宿主とする細胞が目的とする抗体遺伝子を有していない場合には、前述の動物細胞あるいはハイブリドーマからH鎖遺伝子およびL鎖遺伝子をクローニングする必要がある。

ヒト由来の抗体遺伝子は、例えば、ヒトモノクロナール抗体を生産するマウス(W091/10741、Nature genetics vol.15, 146-156(1997))を抗原で免疫し、得られたハイブリドーマより得ることができる。

遺伝子クローニングはゲノムDNAあるいはcDNAライブラリーの適切なプローブDNAによるスクリーニング、あるいはRT-PCR等の方法により行うことができる。例えば、5'RACEによるH鎖可変領域をコードする遺伝子のクローニングは、以下の操作により行うことができる。

(1) 目的のモノクロナール抗体を产生する細胞よりpolyA⁺RNAを単離、精製す

る。

- (2) 得られたpolyA⁺RNAの逆転写物(cDNA)にアダプターDNAをライゲーションしてPCR用鑄型DNAを作成する。
- (3) H鎖定常域の塩基配列をもとにH鎖定常域プライマーを作成する。
- (4) アダプターDNAプライマーとH鎖定常域プライマーによるPCRを行い、部分塩基配列を増幅し、得られたPCR産物の塩基配列を決定する。
- (5) H鎖可変領域翻訳開始点付近の配列、C末端の配列より、それぞれの配列をもとにプライマーを作成する。
- (6) 上記(5)のプライマーを用いて再度PCRを行う。

【00015】

(口) 発現プラスミド(ベクター)の構築

発現プラスミド(ベクター)は、形質転換する細胞の種類に適したエンハンサー、プロモーターや複製開始点等の発現調節配列を有するプラスミドに、ハイブリドーマよりクローニングした抗体遺伝子を常法により組み込んで得ることができる。例えば、pcD2、pBSV、CMD、pSV2等のプラスミドベクターを用いることができる。また、レトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター等のウィルスベクターを用いることも可能である。

形質転換の対象となる細胞は、すでに目的とする抗体遺伝子を内在しているため、H鎖遺伝子だけを1コピー以上含む発現プラスミドを構築すればよい。

可変領域と定常領域の遺伝子の動物種由来が異なるキメラ抗体遺伝子は、例えば、非ヒト動物種の可変領域遺伝子と定常領域遺伝子をクローニングし、別途クローニングしたヒト定常領域が組み込まれているプラスミドに組み込むことでキメラH鎖遺伝子とキメラL鎖遺伝子を構築することができる(例えば、Mol Immunol, vol. 27, 809(1990)、特開昭60-155132号公報参照)。また、抗体定常領域と非Ig性蛋白をコードする遺伝子との連結は、遺伝子組換えの常法により行うことができる(例えば、特表昭62-500352号公報参照)。

なお、さらに導入するH鎖遺伝子のコピー数を増幅するため、dhfrあるいはグルタミン合成酵素をコードする遺伝子を連結してもよい。

【00016】

(ハ) 細胞の形質転換

形質転換の常法により、得られたプラスミド（ベクター）の性質と細胞の性質に応じた適切な形質転換方法、例えばエレクトロポレーション法により行えばよい。すなわち、マーカー遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子）と目的とする抗体遺伝子を保持するプラスミドをエレクトロポレーション法により細胞に導入し、耐性薬剤存在下で培養して目的とする抗体遺伝子を持つ株を得ることができる。

【00017】

(二) 形質転換細胞の培養、抗体の単離

以上のようにして得られた形質転換細胞（ハイブリドーマ、動物細胞）は、高い抗体生産能を有する。そして、この細胞を適切な培地中で培養することにより所望の抗体を高収率で得ることができる。

培地中に蓄積された抗体は常法により分離精製することができる。これらの分離精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の電荷の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法が挙げられる。

以下に、抗IL-8ヒトIgG2を生産するハイブリドーマよりH鎖をコードする遺伝子をクローニングして、これを発現ベクターに挿入し、該発現ベクターにより該ハイブリドーマを形質転換して抗体を生産した例を示す。

なお、本発明がここに示される例に限定されることは勿論である。

【00018】

【実施例】

【実施例1】ハイブリドーマK2.2.1の製造

ヒト抗体遺伝子を有するマウスをIL-8で免疫し、得られた脾臓細胞をマウスマローマ細胞（NSO-bc12）と融合してハイブリドーマK2.2.1を得た（Michael Me ndez et al, Nature genetics vol.15, 146-156(1997)）。

【00019】

【実施例2】ハイブリドーマK2.2.1からのH鎖単離

ハイブリドーマK2.2.1からFastTrack kit (Invitrogen) を用いてpolyA⁺RNAを単離、精製した。

次いでMarathon cDNA Amplification kit (CLONTECH) を用いて、5' RACEを行い、H鎖可変領域を含む部分配列を増幅して、その塩基配列を決定した。すなわち、ハイブリドーマK2.2.1から得られたpolyA⁺RNAを逆転写して得られたcDNAにアダプターDNAをライゲーションしてPCR用鑄型DNAを作成し、H鎖定常域プライマーHG2-3-437（配列番号2）とアダプターDNAプライマーによるPCRを行い、部分塩基配列を増幅した。得られたPCR産物をDye Terminator Cycle Sequence kit (PE Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

ついで、得られた部分塩基配列の翻訳開始点付近の配列をもとにプライマーVH4-21（配列番号3）およびCG2-1（配列番号4）を合成した。プライマーVH4-21およびCG2-1を用いて再度PCRを行い、得られたDNAの塩基配列をDye Terminator Cycle Sequence kit (PE Applied Biosystems) により決定し、H鎖全cDNAと判定した。H鎖全塩基配列を配列番号1に示す。

【00020】

【実施例3】プラスミドpDH502の構築～ハイブリドーマK2.2.1の形質転換、抗体生産

得られたハイブリドーマK2.2.1由来のH鎖cDNAをpLS407のEcoR1サイトに挿入し、発現ベクターpDH502（第1図）を得た。

組み込まれたcDNAはCMVエンハンサー／ニワトリBアクチンプロモーターにより転写されるように、また、同ベクター上にマーカーとしてdhfr遺伝子があるため、メソトレキセイト(MTX)で選択できるようにデザインされている。

ハイブリドーマK2.2.1に発現プラスミドpDH502をエレクトロポレーションにより取り込ませた後、選択培地 (IMDM (JRH BIOSCIENCE), 10%FBS, 300mM MTX) 中で生育してきた約100個の形質転換体を培養上清中のヒトIgG2をELISAで測定してスクリーニングした。なお、ELISAはサンドイッチ法で、固相抗体として抗ヒトIgG(Fc) (Organon Teknika)、検出抗体としてHRP-抗ヒトkappa (PROTOS IMMUNORESEARCH)、標準品としてヒトIgG kappa (The Binding Site) を用いた。

宿主として使用したハイブリドーマK2.2.1はヒトIL-8抗体を元来生産しているので、IgH遺伝子の導入付加による抗体発現量改善効果を調べるために、宿主の抗体発現量を比較した。比較する細胞は、宿主として使用したハイブリドーマからクローニングした約100個のクローンを用いた。

結果を第2図および表1に示す。導入プラスミドベクター上のH鎖遺伝子発現だけで抗体分子全体の発現量が改善されたことを示している。

【表1】

形質転換体の抗体生産性

クローンNo.	ヒト IgG 量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
12*	10.3
15*	37.3
20	5.6
41*	10.0
50	1.7
53	0.34
54	3.4
57	5.5
63	0.49
89*	7.0
96	4.8

*印クローニング/MTX選択

さらに、得られた形質転換体を限界希釀法によりクローニングするとNo.15細胞からは、90ug/ml以上の抗体生産能を示すクローンが得られた（参考例に示す表2の「形質転換体クローン」を参照）。

【00021】

【参考例】MTX選択による遺伝子増幅

実施例3の形質転換により得られた細胞から、比較的抗体発現量が高い細胞No.12、15、41および89を選び、dhfr遺伝子増幅に伴う抗体H鎖の増加による抗体生産量の増加を期待して、MTXによる選択培養を行った。

1、2あるいは5uMの濃度のMTXを含む培地中で細胞を選択し、実施例3の方法と同様にして、ヒト抗体濃度をELISAにより測定した。結果を表2に示す。

【表2】

ヒト IgG2 の生産性

クローン	ヒト IgG (μ g/m l)	細胞 No. (Cells/ml)	時間 (日数)	生産性 (pg/cell/day)
形質転換体				
12-6	18. 2	3. 20E+05	3	19
15-4	95. 3	3. 00E+05	5	64
15-12	66. 9	3. 20E+05	5	42
41-2	24. 5	3. 35E+05	6	12
85-9	15. 9	3. 40E+05	3	16
MTX増幅				
12-5u-96-8	23. 6	5. 25E+05	4	11
15-1u-82-1	107	7. 30E+05	4	37
15-1u-87-4	67. 1	5. 55E+05	4	30
41-2u75-4	19. 6	8. 20E+05	4	6
89-2u-2-5	11. 9	6. 15E+05	4	5
89-2u-33-12	11. 8	6. 65E+05	4	4

それぞれ得られたMTX耐性細胞の抗体生産はクローニング前の親細胞に比べ高くなった（表2の「MTX増幅」）。

このことからも、H鎖遺伝子の発現を改善することにより、抗体発現量が向上することが分かる。

【00022】

【発明の効果】

以上述べたように、本発明の方法により細胞による抗体生産において、抗体の発現量を改善することが可能となる。特に、H鎖遺伝子発現が不安定、あるいは低いがためにH鎖、L鎖を含む抗体全体の発現が低くなっているハイブリドーマにおいて抗体生産性を改善することのできる有効な方法である。

【00023】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc

<120> Method for preparing antibody

<130>

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1507

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(1400)

<400> 1

gaattcggct t atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctc ctg gtg gca gct 50

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala

1

5

10

ccc aga tgg gtc ctg tcc cag gtt cag cta cag cag tgg ggc gca gga 98

Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly

15

20

25

ctg ttg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt 146

Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly

30

35

40

45

ggg tcc ttc agt ggt tac tac tgg acc tgg atc cgc cag ccc cca ggg 194

Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly

50

55

60

aag ggg ctg gag tgg att ggg gaa atc att cat cat gga aac acc aac 242

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Ile His His Gly Asn Thr Asn

65

70

75

tac aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc tcc ata tca gtt gac acg tcc 290

Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr Ser

80

85

90

aag aac cag ttc tcc ctg aca ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg 338

Lys Asn Gln Phe Ser Leu Thr Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr

95

100

105

gct gtg tat tac tgt gcg aga ggg gga gca gtg gct gcg ttt gac tac 386

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ala Val Ala Ala Phe Asp Tyr

110

115

120

125

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc 434

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

130

135

140

cca tcg gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc acc tcc gag agc 482

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser

145

150

155

aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg 530

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

160

165

170

acg gtg tcg tgg aac tca ggc gct ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc 578
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

175

180

185

cca gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg 626
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 190 195 200 205

acc gtg ccc tcc agc aac ttc ggc acc cag acc tac acc tgc aac gta 674
 Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aca gtt gag cgc aaa 722
 Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 225 230 235

tgt tgt gtc gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga ccg 770
 Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 240 245 250

tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc 818
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 255 260 265

cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gac gac gtg agc cac gaa gac 866
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 270 275 280 285

ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat 914
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300

gcc aag aca aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg 962
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
 305 310 315

gtc agc gtc ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag 1010
 Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 320 325 330

tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa 1058
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 335 340 345

acc atc tcc aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc 1106
 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 350 355 360 365

ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc 1154
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag 1202
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395

agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg 1250

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu

400

405

410

gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag 1298

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

415

420

425

agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag 1346

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

430

435

440

445

gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt 1394

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

450

455

460

aaa tga gtgccacggc cggcaagccc ccgcgtccccca ggctctcggt gtcgcgtgag 1450

Lys

gaatgcgttggc acgtaccccg tgtacatact tcccaggcac ccagcaaagc cgaattc 1507

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: HG2-3-437

<400> 2

gtgttaggtct gggtgccgaa gtt

23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: VH4-21

<400> 3

atgaaaacacc tgtggttctt cct

23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CG2-1

<400> 4

gctgggtgcc tgggaagtat gta

23

【00024】

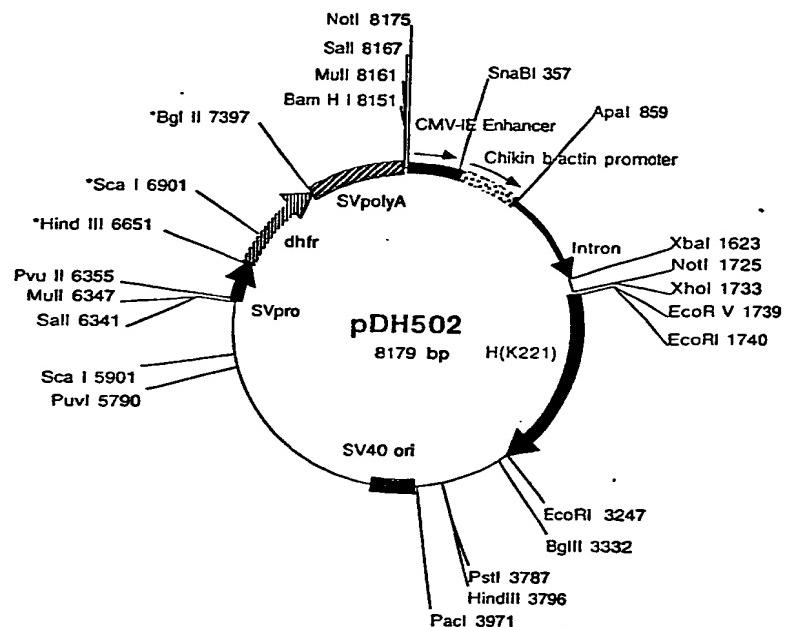
【図面の簡単な説明】

第1図は発現ベクターpDH502の構造を示す。

第2図は形質転換体の抗体生産量を示す。

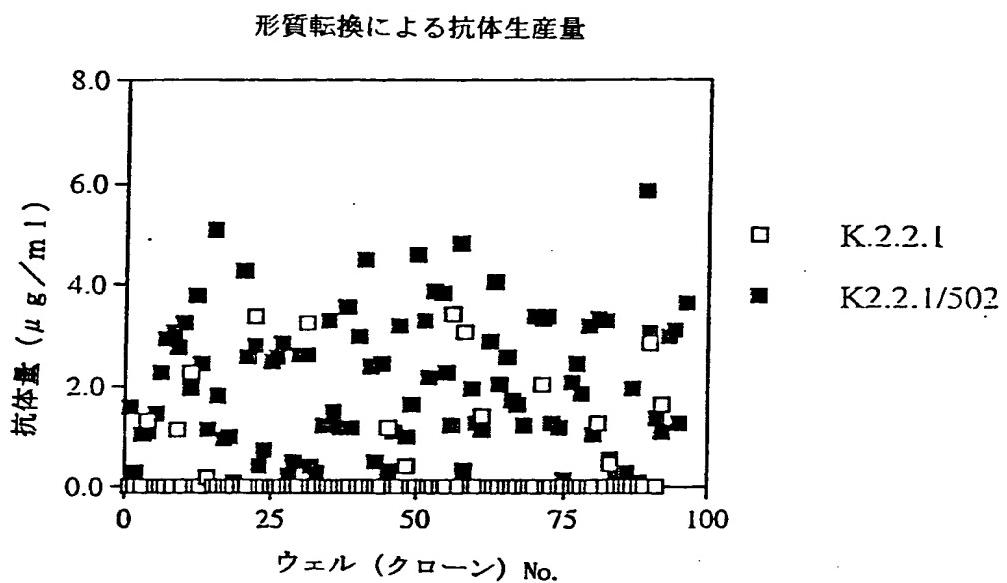
【書類名】図面

【第1図】



pDH502 の構築図

【第2図】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 本発明は、簡便な操作で確実に、形質転換細胞によるモノクロナール抗体の発現効率を高めることを目的とする。特に、これまで抗体発現量を向上させることが困難であったハイブリドーマによる発現効率を改善することを目的とする。

【解決手段】 IgH鎖遺伝子およびIgL鎖遺伝子を有する細胞によるモノクロナール抗体の製造方法であって、①該IgH鎖遺伝子と同じアミノ酸配列をコードするIgH鎖遺伝子1コピー以上を細胞に導入する工程、②得られた形質転換細胞を培養する工程、よりなることを特徴とする抗体の製造方法。

【選択図】なし

認定・付加情報

特許出願の番号 平成11年 特許願 第087929号
受付番号 59900292419
書類名 特許願
担当官 兼崎 貞雄 6996
作成日 平成11年 4月28日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成11年 3月30日

次頁無

【書類名】出願人名義変更届
【整理番号】J1-A0001
【提出日】平成12年 4月19日
【あて先】特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】平成11年特許願第 87929号
【承継人】
【識別番号】598015316
【氏名又は名称】アブジェニックス インコーポレイテッド
【承継人代理人】
【識別番号】100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】清水 初志
【承継人代理人】
【識別番号】100108774
【弁理士】
【氏名又は名称】橋本 一憲
【手数料の表示】
【予納台帳番号】041092
【納付金額】4,200円
【提出物件の目録】
【包括委任状番号】9905116
【ブルーフの要否】要

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第087929号
受付番号	50000496214
書類名	出願人名義変更届
担当官	兼崎 貞雄 6996
作成日	平成12年 5月31日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	598015316
【住所又は居所】	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント ダムバートン サークル 7601
【氏名又は名称】	アブジェニックス インコーポレイテッド
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志
【承継人代理人】	
【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	橋本 一憲

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

氏 名 日本たばこ産業株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [598015316]

1. 変更年月日 1997年12月18日

[変更理由] 新規登録

住 所 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント ダムバート
ン サークル 7601

氏 名 アブジェニックス インコーポレイテッド

